

Citation for published version:

Gebhard, S & Dintner, S 2014, 'Peptidantibiotika — Frühwarnsysteme und Katastrophenschutz bei Bakterien', *BIOspektrum*, vol. 20, no. 3, pp. 263-266. <https://doi.org/10.1007/s12268-014-0437-y>

DOI:

[10.1007/s12268-014-0437-y](https://doi.org/10.1007/s12268-014-0437-y)

Publication date:

2014

Document Version

Peer reviewed version

[Link to publication](https://doi.org/10.1007/s12268-014-0437-y)

The final publication is available at Springer via <http://dx.doi.org/10.1007/s12268-014-0437-y>

University of Bath

Alternative formats

If you require this document in an alternative format, please contact:
openaccess@bath.ac.uk

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Themenstichwort: Antibiotikaresistenz

Peptidantibiotika – Frühwarnsysteme und Katastrophenschutz bei Bakterien

Susanne Gebhard , Sebastian Dintner
Department Biologie I, Mikrobiologie, LMU München

In their habitats, microorganisms are often in competition for limited nutrients, and many Gram-positive bacteria resort to production of peptide antibiotics to succeed. Consequently, resistance against these compounds is essential. The first step in ensuring survival is the detection of the toxic peptides. Interestingly, many of the sensory proteins lack obvious binding domains. We investigate how such proteins are able to detect their substrates and regulate resistance.

Viele bakterielle Habitate, wie zum Beispiel der Boden, weisen trotz limitierter Ressourcen hohe Populationsdichten auf. Eine Strategie, um sich in solch umkämpften Lebensräumen zu behaupten, ist die Produktion von Antibiotika zur Hemmung des Wachstums von Konkurrenten. Eine Gruppe solcher Substanzen sind antimikrobielle Peptide, die vor allem von Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt, den Firmicutes, produziert werden und hauptsächlich auf andere Gram-positive Bakterien wirken. Diese Peptide sind strukturell sehr divers und beinhalten unter anderem die ribosomal synthetisierten und stark modifizierten Lantibiotika (z.B. Nisin), nicht-ribosomal synthetisierte zyklische Peptide (z.B. Bacitracin), oder zyklische Lipopeptidpeptide (z.B. Ramoplanin) (1) (Abb. 1A).

Angriffsziel dieser Antibiotika ist der Lipid II-Zyklus der Zellwandsynthese (Abb. 1B). Das Vorläufermolekül des Peptidoglykans, N-Acetylglucosamin-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid, wird auf der zytoplasmatischen Seite der Membran, gekoppelt an das Trägermolekül Undecaprenyl-Phosphat (UP), synthetisiert. Der daraus resultierende, als Lipid II bezeichnete Komplex, wird zur extrazellulären Seite transloziert, wo die Vorläufermoleküle in die wachsende Zellwand eingebaut werden. Dieser Schritt der Zellwandsynthese wird zum Beispiel durch Lantibiotika wie Nisin gehemmt, indem diese an die Pyrophosphatgruppe des Lipid II binden (1). Nach dem Einbau der Peptidoglykanvorläufer bleibt das Trägermolekül in der Pyrophosphatform zurück (UPP) und wird durch Dephosphorylierung regeneriert. Dieser Schritt des Zyklus wird durch Bacitracin gehemmt, welches an UPP binden kann (1). Weitere Schritte der Zellwandsynthese, die durch Antibiotika gehemmt werden können, sind in Abbildung 1B aufgeführt. Gram-negative Bakterien besitzen zwar ebenfalls einen Lipid II-Zyklus, allerdings sind sie gegen die hier aufgeführten Substanzen weitgehend resistent, da diese nicht die äußere Membran passieren können.

Resistenzstrategien gegen Peptidantibiotika

Zum Schutz vor Peptidantibiotika findet sich bei den Gram-positiven Bakterien eine Vielzahl verschiedener Resistenzmechanismen. Da die Peptide meist eine positive Nettoladung tragen (Abb. 1A), beruht einer dieser Mechanismen auf einer Änderung der Oberflächenladung der Bakterienhülle. Dies wird zum Beispiel dadurch erreicht, dass die negativ geladenen Teichonsäuren durch das DltABCDE System mit D-Alanin modifiziert werden. Neben der Ladungsänderung führt dies auch zu einer Verdichtung der Zellwand,

was durch sterische Hinderung ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz führen kann (2). Ein ähnlicher Mechanismus beruht auf der Lysinylierung des Membranphospholipids Phosphatidylglycerin durch MprF (3). Spezifische Resistenz gegenüber Bacitracin wird unter anderem durch vermehrte Produktion von UPP-Phosphatasen vermittelt, wodurch das Zielmolekül des Antibiotikums schneller dephosphoryliert und somit von der Zelloberfläche entfernt werden kann. In *Bacillus subtilis* oder *Enterococcus faecalis* wird dies durch die UPP-Phosphatase BcrC vermittelt (4, 5). Den effizientesten Resistenzmechanismus gegen eine Vielzahl von Peptidantibiotika stellen jedoch ATP-abhängige (ABC)-Transporter dar. Hierbei können zwei Gruppen von Transportern unterschieden werden. Die erste Gruppe umfasst Transporter, deren zwei Permeasen jeweils sechs Transmembranhelices aufweisen (Abb. 2), wobei diese von einem einzelnen oder zwei getrennten Genen kodiert sein können. Hierzu gehören die Transporter der LanFEG- und BcrAB-Familien (6), die vor allem bei der Selbstimmunität von Produzentenstämmen von Peptidantibiotika eine Rolle spielen. Transporter der zweiten Gruppe besitzen Permeasen mit zehn Transmembranhelices und einer großen extrazellulären Domäne (Abb. 3). Diese Transporter werden zusammenfassend als BceAB-artige Systeme bezeichnet (6).

Wahrnehmung von Peptidantibiotika

Der erste essentielle Schritt zur Ausprägung einer Resistenz ist die rechtzeitige Detektion von schädlichen Peptiden im Umfeld der Zelle und die daran gekoppelte Signaltransduktion ins Zellinnere, die schließlich in der Expression von Resistenzgenen resultiert. Hierbei ist auffällig, dass viele der Sensorproteine für Peptidantibiotika über keine extrazellulären Bindedomänen verfügen. Es ist daher nicht offensichtlich, wie diese Proteine die Peptide erkennen können.

Einer für Alles: der Bacitracinsensor BcrR. Ein Beispiel für ein solches Sensorprotein ist der Einkomponentenregulator BcrR von *E. faecalis*, der die Produktion des Transporters BcrAB und damit die Resistenz gegen Bacitracin reguliert (6, 7). BcrR ist ein ungewöhnliches Regulatorprotein, da es neben einer DNA-Bindedomäne über vier Transmembranhelices verfügt (Abb. 2). Mittels genetischer und biochemischer Ansätze konnten wir zeigen, dass BcrR tatsächlich in der Membran lokalisiert ist, sowohl DNA als auch Bacitracin direkt bindet, und die Aktivität der RNA-Polymerase am Zielpromotor positiv beeinflusst (7). Hieraus ließ sich ein Modell für den Funktionsmechanismus von BcrR ableiten (Abb. 2), nach dem das Protein in der Zelle stets an seinen Zielpromotor gebunden ist, wobei hierfür wahrscheinlich zwei Dimere, oder alternativ ein Tetramer von BcrR erforderlich sind. Die dauerhafte DNA-Bindung ist für einen membranständigen Regulator eventuell notwendig, um bei Bedarf eine schnelle Promotoraktivierung zu gewährleisten, ohne dass die Ziel-DNA erst lokalisiert werden muss. Die Gegenwart von Bacitracin wird durch direkte Bindung von BcrR erkannt, was zur Aktivierung der RNA-Polymerase und somit zur Erhöhung der Transkription führt. Die Bacitracin-Bindung erfolgt hierbei vermutlich an oder innerhalb der Membran, da BcrR wie erwähnt keine extrazelluläre Domänen besitzt. Wie die Detektion von Bacitracin in die Aktivierung der RNA-Polymerase umgesetzt wird, ist bislang aber noch ungeklärt.

Gemeinsam stark: Resistenzmodule. Ein weiteres Sensorprotein ohne offensichtliche extrazelluläre Bindedomäne ist die Histidinkinase BceS von *B. subtilis*. Zusammen mit dem Antwortregulator BceR bildet BceS ein klassisches Zweikomponentensystem, das die Produktion des Transporters BceAB reguliert, welcher wiederum für die Resistenz gegen mehrere Peptidantibiotika, wie z.B. Bacitracin, verantwortlich ist (6) (Abb. 3). Für dieses

System konnte gezeigt werden, dass BceS allein tatsächlich nicht in der Lage ist auf Bacitracin zu reagieren, sondern stattdessen für die Reizwahrnehmung auf den Transporter BceAB angewiesen ist (8). Somit funktioniert der Transporter nicht nur als Resistenzdeterminante, sondern gleichzeitig als Sensorprotein, und ist somit in der Lage seine eigene Produktion zu regulieren. Eine phylogenetische Studie zeigte, dass BceRS-artige Zweikomponentensysteme und BceAB-artige Transporter bei firmicuten Bakterien weit verbreitet sind, und sich über Co-Evolution gemeinsam zu sogenannten Resistenzmodulen gegen Peptidantibiotika entwickelt haben (9). Viele der untersuchten Genome besitzen sogar mehrere solcher Module. In einigen Arten, wie z.B. *Staphylococcus aureus* und *E. faecalis*, kommt es hierbei zu einer funktionellen Spezialisierung der Transporter: Ein System ist ausschließlich für die Wahrnehmung des Peptids und Aktivierung der Signaltransduktion verantwortlich, wohingegen der zweite Transporter die eigentliche Resistenz vermittelt (10, 11).

Bce-artige Resistenzmodule stellen somit in der Tat ein weit verbreitetes Prinzip der Resistenz gegen Peptidantibiotika bei firmicuten Bakterien dar. Unsere aktuelle Forschung befasst sich damit, wie die Kommunikation zwischen Transportern und Histidinkinasen bewerkstelligt wird. Langfristig betrachtet können solche und andere sensorische Prozesse attraktive Angriffsziele für neue Wirkstoffe, die bestehende Resistenzen unterbinden sollen, darstellen.

Danksagung

Die Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Literatur

1. Schneider T, Sahl H-G (2010) An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:161–169
2. Revilla-Guarinos A, Gebhard S, Mascher T *et al.* (2014) Defence against antimicrobial peptides: different strategies in Firmicutes. *Environmental Microbiology* doi: 10.1111/1462-2920.12400
3. Ernst C M, Peschel A (2011) Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids. *Mol. Microbiol.* 80:290–299
4. Cao M, Helmann J D (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis* *bcrC* bacitracin resistance gene by two extracytoplasmic function sigma factors. *J. Bacteriol.* 184:6123–6129
5. Shaaly A, Kalamorz F, Gebhard S *et al.* (2013) Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase confers low-level resistance to bacitracin in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68:1583–1593
6. Gebhard S (2012) ABC transporters of antimicrobial peptides in Firmicutes bacteria - phylogeny, function and regulation. *Mol. Microbiol.* 86:1295–1317
7. Gebhard S, Gaballa A, Helmann J D *et al.* (2009) Direct stimulus perception and transcription activation by a membrane-bound DNA binding protein. *Mol. Microbiol.* 73:482–491
8. Rietkötter E, Hoyer D, Mascher T (2008) Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 68:768–785
9. Dintner S, Staron A, Berchtold E *et al.* (2011) Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes Bacteria. *J. Bacteriol.* 193:3851–3862
10. Hiron A, Falord M, Valle J *et al.* (2011) Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. *Mol. Microbiol.* 81:602–622
11. Gebhard S, Fang C, Shaaly A *et al.* (2013) Identification and characterisation of a bacitracin resistance network in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi: 10.1128/AAC.02111-13

Korrespondenzadresse:

Susanne Gebhard, PhD/Otago
Ludwig-Maximilians-Universität München
Department Biologie I, Mikrobiologie
Großhaderner Str. 2-4
D-82152 Martinsried
Tel.: 089-2180-74601
Fax: 089-2180-74626
susanne.gebhard@bio.lmu.de
www.syntheticmicrobe.bio.lmu.de/members/gebhard

Abbildungslegenden

Abb. 1: Der Lipid II-Zyklus als Angriffsziel für Peptidantibiotika. **A**, Schema einiger Peptidantibiotika. **B**, Der Lipid II-Zyklus. Details s. Text; Hemmung durch Peptidantibiotika in rot; Peptidkomposition am Beispiel von *S. aureus*. Modifiziert nach (1,2).

Abb. 2: Der Einkomponentenregulator BcrR von *E. faecalis*. BcrR-1 und BcrR-2 zeigen die DNA-Bindestellen. Details s. Text. Modifiziert nach (7).

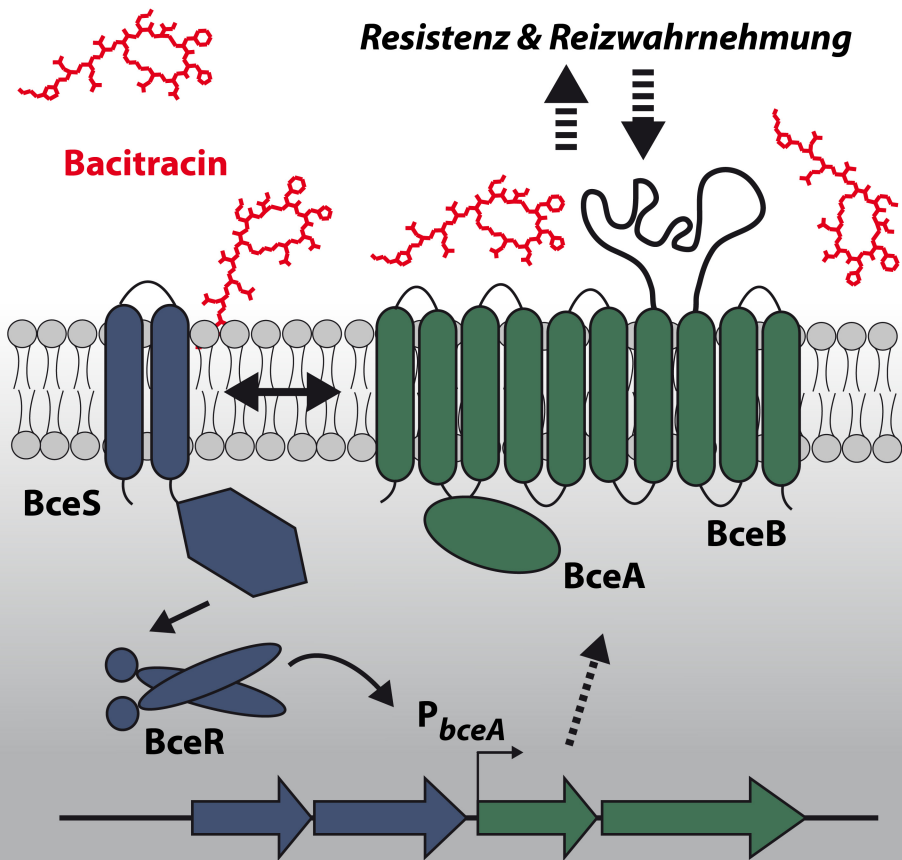
Abb. 3: Das BceRS-BceAB Resistenzmodul von *B. subtilis*. Der Doppelpfeil zeigt die Kommunikation zwischen BceS und BceAB. Modifiziert nach (8).

Kurzvitae:**Susanne Gebhard**

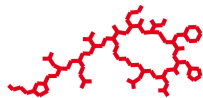
Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel und an der University of Waikato, Hamilton, Neuseeland. **2003-2006** Promotion an der University of Otago, Dunedin, Neuseeland. **2006-2009** Postdoktorandin an der University of Otago und am Karlsruher Institut für Technologie. Seit **2009** Wissenschaftliche Assistentin und Nachwuchsgruppenleiterin im Bereich Mikrobiologie an der LMU München. **2014** Habilitation in Mikrobiologie.

Sebastian Dintner

Biologiestudium am KIT Karlsruhe. **2010** externe Diplomarbeit an der LMU München. Seit **2010** Doktorand im Bereich Mikrobiologie an der LMU München.

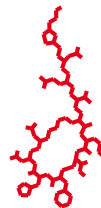


Reizwahrnehmung



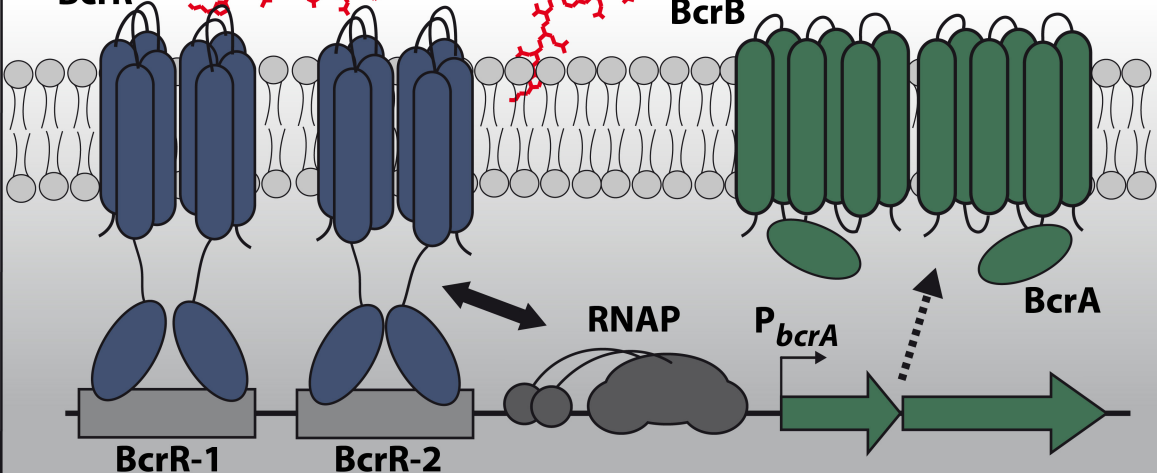
Bacitracin

Resistenz



BcrR

BcrB



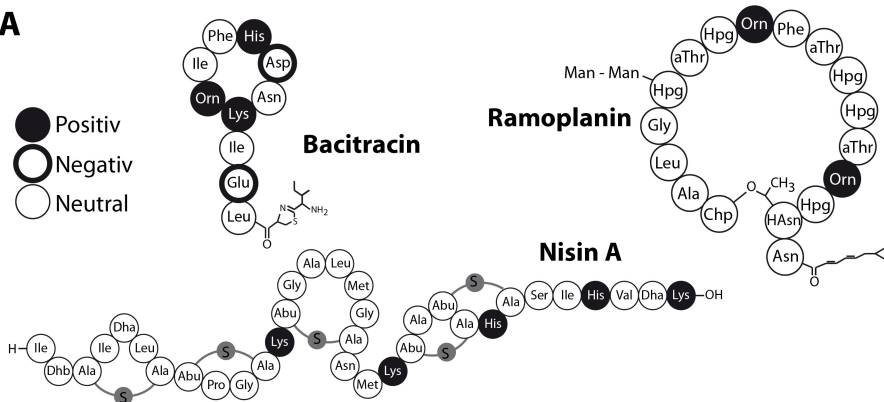
BcrR-1

BcrR-2

RNAP

P_{bcrA}

BcrA

A**B**